

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:  
Yoshio Fujii, et al.

Application No.: Not Yet Assigned

Group Art Unit: N/A

Filed: June 13, 2001

Examiner: Not Yet Assigned

For: COMPUTERIZED METHOD AND  
APPARATUS FOR ANALYZING AMINO  
ACIDS



#3  
C-7  
4/8/02

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following  
prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2000-269864	September 1, 2000

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is  
filed herewith.

Dated: June 13, 2001

Respectfully submitted,

By

Mark J. Thronson

Registration No.: 33,082

DICKSTEIN SHAPIRO MORIN &  
OSHINSKY LLP

2101 L Street NW

Washington, DC 20037-1526

(202) 775-4742

Attorneys for Applicant

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 9月 1日

出 願 番 号

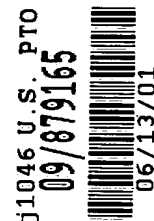
Application Number:

特願2000-269864

出 願 人

Applicant (s):

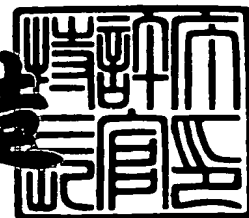
株式会社日立製作所



2001年 3月23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3021715

【書類名】 特許願

【整理番号】 1100015331

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 31/08

【発明の名称】 アミノ酸分析方法および装置

【請求項の数】 11

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字津田字関場 1 9 3 9 番地  
那珂インスツルメンツ株式会社内

【氏名】 藤井 芳雄

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 8 8 2 番地  
株式会社 日立製作所 計測器グループ内

【氏名】 伊藤 正人

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市大字市毛 1 0 4 0 番地  
株式会社 日立サイエンスシステムズ内

【氏名】 甲田 公良

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

【識別番号】 100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】 作田 康夫

【電話番号】 03-3212-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013088

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アミノ酸分析方法および装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一つまたは複数種が混合された緩衝液に試料を導入し、分離カラムを通過させて、生体液アミノ酸類縁物質を検出対象とした生体液分析を行うアミノ酸分析方法において、

前記試料が導入される緩衝液のリチウムイオン濃度を、少なくとも  $\beta$ -アミノイソ酪酸 ( $\beta$ -A i B A) が溶出される時間まで  $0.3 \text{ mol/L}$  以下とすることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 2】

請求項 1 のアミノ酸分析方法において、

前記  $\beta$ -アミノイソ酪酸 ( $\beta$ -A i B A) が溶出される時間まで、前記緩衝液の  $\text{pH}$  を  $3.5$  以下とすることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 3】

請求項 1 のアミノ酸分析方法において、

$\gamma$ -アミノ-n-酪酸 ( $\gamma$ -A B A) からヒドロオキシリジン (H y l y s) までの溶出時間で、前記緩衝液のリチウムイオン濃度と  $\text{pH}$  をグラジエントに上昇させることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 4】

請求項 3 のアミノ酸分析方法において、

前記リチウムイオン濃度は、 $0.44 \text{ mol/L}$  から  $1.00 \text{ mol/L}$  にかけて、

前記  $\text{pH}$  は、 $3.66$  から  $4.1$  にかけて上昇させることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 5】

請求項 1 のアミノ酸分析方法において、

ヒドロオキシリジン (H y l y s) からヒスチジン (H i s) までの溶出時間で、前記緩衝液のリチウムイオン濃度を  $0.81 \text{ mol/L}$ 、 $\text{pH}$  を  $4.00$  とすることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 6】

請求項 5 のアミノ酸分析方法において、

ヒスチジン (H i s) 溶出後は、前記緩衝液のリチウムイオン濃度を 1.0 0 mol/L、pH を 4.1 とすることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 7】

請求項 1 のアミノ酸分析方法において、

バリン (v a l) からホモシトルリン (H C i t) の溶出時間で、カラム温度を 7 0℃ とすることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 8】

請求項 1 のアミノ酸分析方法において、

チロシン (T y r) の溶出時間から、カラム温度を 7 0℃ とすることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 9】

請求項 1 のアミノ酸分析方法において、

システイン-ホモシステイン ミクスド ジスルフィド (C y s - H C y s) からトリプトファン (T r p) の溶出時間で、カラム温度を 6 3℃ とすることを特徴とするアミノ酸分析方法。

【請求項 1 0】

一つまたは複数種が混合された緩衝液を用いて、ホスホセリン (P - S e r) , タウリン (T a u) , ホスホエタノールアミン (P E A) , ウレア (U r e a) , アスパラギン酸 (A s p) , ハイドロオキシプロリン (H y p r o) , メチオニンスルホキッド (M e t S O X) , スレオニン (T h r) , セリン (S e r) , アスパラギン (A s p N H 2) , グルタミン酸 (G l u) , グルタミン (G l u N H 2) , サルコシン (S a r) ,  $\alpha$ -アミノ アデピン酸 ( $\alpha$ -A A A) , プロリン (P r o) , グリシン (G l y) , アラニン (A l a) , シトルリン (C i t) ,  $\alpha$ -アミノ-n-酪酸 ( $\alpha$ -A B A) , バリン (V a l) , ピペコリン酸 (P i p e c o) , ホモシステイン (H C y s H) , メチオニン (M e t) , ホモシトルリン (H C i t) , アローイソロイシン (A l l o - I l e) , シスチン (C y s) , サッカロピン (S a c c h a) , イソロイシン (I l e) ,

ロイシン (Leu), チロシン (Tyr), シスタチオニン (Cyst hi), フェニルアラニン (Phe), アルギニノコハク酸 (ASA), システイン-ホモシステイン ミクスド ジスルフィド (Cys-Hcys),  $\beta$ -アラニン ( $\beta$ -Ala), アミノ レブリン酸 (ALe vA),  $\beta$ -アミノイソ酪酸 ( $\beta$ -AiBA),  $\gamma$ -アミノ-n-酪酸 ( $\gamma$ -ABA), ホモシスチン (HCys), アルギニノコハク酸 アンヒドライド 1 (ASA-Anhy1), エタノールアミン (EOHNH<sub>2</sub>), トリプトファン (Trp), アンモニア (NH<sub>3</sub>), ハイドロオキシリジン (Hyl ys), アミノエチルシステイン (AEC), オルニチン (Orn), リジン (Lys), 1-メチル ヒスチジン (1Me his), ヒスチジン (His), 3-メチル ヒスチジン (3Me his), アンセリン (Ans), カルノシン (Car), アルギニン (Arg) の各成分を分析対象成分として分析を行うアミノ酸分析方法であって、

前記緩衝液のリチウムイオン濃度を、少なくとも前記  $\beta$ -アミノイソ酪酸 ( $\beta$ -AiBA) が溶出される時間まで 0.3 mol/L 以下とし、ハイドロオキシリジン (Hyl ys) からヒスチジン (His) までの溶出時間で、0.81 mol/L に保持することを特徴とするアミノ酸分析方法。

#### 【請求項11】

複数の緩衝液を各緩衝液毎に設けられたバルブを調整することで混合し、当該混合された緩衝液に試料を導入し、分離カラムを通過させて、生体液アミノ酸類縁物質を検出対象とした生体液分析を行うアミノ酸分析装置において、

前記混合後の緩衝液のリチウムイオン濃度が、少なくとも前記  $\beta$ -アミノイソ酪酸 ( $\beta$ -AiBA) が溶出される時間まで 0.3 mol/L 以下であり、ハイドロオキシリジン (Hyl ys) からヒスチジン (His) までの溶出時間で、0.81 mol/L に保持されるように、前記バルブを制御して緩衝液の流量調整を行うことを特徴とするアミノ酸分析装置。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床分野に好適なアミノ酸分析方法および装置に関する。

## 【 0 0 0 2 】

## 【従来の技術】

アミノ酸分析計は大別して、蛋白加水分解物アミノ酸約 2 0 成分を対象とした標準分析法と、生体液アミノ酸類縁物質約 4 0 成分を対象とした生体液分析法を行うものに分類できる。ここでは生体液分析法、すなわち、血清や尿、髄液などの生体液を分析し、これを臨床的に利用して、病気の診断や、治療に役立てることができる分析法について述べる。

## 【 0 0 0 3 】

生体液分析法を示した例としては、特開昭 5 3 - 6 0 2 9 1 号公報、特開昭 5 9 - 1 0 8 4 9 号公報、特開平 4 - 1 9 4 5 7 0 号公報、特開平 9 - 8 0 0 3 7 号公報等がある。また、報告文として、Journal of Chromatography, 224 ; 315-321(1981)「Resolution of 52 ninhydrin-positive compounds with a High-speed amino acid analyzer」、Clinical Chemistry 43 ; 8, 1421-1428(1997)「Amino Acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of Hitachi L-8500A」がある。

## 【 0 0 0 4 】

これら、従来の生体液分析法は、複数の緩衝液を混合し、混合した緩衝液に試料を添加し、分離カラムを通過させて検出するという一連の分析手法は変わるところはないが、分離カラムや緩衝液の流速などを工夫することにより、時代と共に分析時間が早くなり、通常は 1 1 0 分、高速の場合でも 9 0 - 6 0 分で分析できるようになった。

## 【 0 0 0 5 】

## 【発明が解決しようとする課題】

生体液分析法では、現在上記に示したように約 4 0 成分（厳密には、表 1 に示した \* 印の付されていない 4 1 成分）の分析を一斉に行うことができる。ところが最近、これまで分析対象となっていなかったような成分が特定の病気を知るために有効であることが発見され、上記 4 1 成分に加え、それらの成分を合わせて分析したいという要求が高まりつつある。具体的には、表 1 の \* 印の付された 1 2 成分が従来にない新たな分析対象成分である。当然、これら新たな 1 2 成分



は、既存の 41 成分と同時に分析でき、且つそれぞれのピークが分離できることが望ましい。即ち、53 成分のアミノ酸を一斉同時分析しようという要求が生じつつある。

表 1-1

アミノ酸 53 成分リスト

NO.	略語	追加分	生体液アミノ酸成分名 (英文)	和名
1	P-Ser		Phosphoserine	ホスホセリン
2	Tau		Taurine	タウリン
3	PEA		Phospho ethanol Amine	ホスホエタノールアミン
4	Urea		Urea	ウレア
5	Asp		Aspartic acid	アスパラギン酸
6	Hpro		Hydroxy proline	ハイドロオキシプロリン
7	MetSOX	*	Methionine sulfoxides	メチオニンスルホキシド
8	Thr		Threonine	スレオニン
9	Ser		Serine	セリン
10	AspNH <sub>2</sub>		Asparagine	アスパラギン
11	Glu		Glutamic acid	グルタミン酸
12	GluNH <sub>2</sub>		Glutamine	グルタミン
13	Sar		Sarcosine	サルコシン
14	$\alpha$ -AAA		$\alpha$ -amino adipic acid	$\alpha$ -アミノ アデピン酸
15	Pro		Proline	プロリン
16	Gly		Glycine	グリシン
17	Ala		Alanine	アラニン
18	Cit		Citrulline	シトルリン
19	$\alpha$ -ABA		$\alpha$ amino-n-butyric acid	$\alpha$ -アミノ-n-酪酸
20	Val		Valine	バリン
21	Pipeco	*	Pipecorinic acid	ピペコリン酸
22	HCysII	*	Homocysteine	ホモシステイン
23	Met		Methionine	メチオニン
24	HCit	*	Homocitrulline	ホモシトルリン
25	Allo-Ile	*	Allo isoleucine	アローイソロイシン
26	Cys		Cystine	シスチン
27	Saccha	*	Saccharopine	サッカロピン
28	Ile		Isoleucine	イソロイシン
29	Leu		Leucine	ロイシン
30	Tyr		Tyrosine	チロシン
31	Cysthi		Cystachionine	シスタチオニン
32	Phe		Phenylalanine	フェニルアラニン
33	ASA	*	Arginino saccinic acid	アルギニノコハク酸
34	Cys-Hcys	*	Cysteine-Homocysteine mixed disulfides	システイン-ホモシステイン ミクスド ジスルフィド
35	$\beta$ -Ala		$\beta$ -Alanine	$\beta$ -アラニン

【 0 0 0 6 】

表 1-2

36	ALeV	*	Amino levulinic acid	アミノ レブリン酸
37	$\beta$ -AiBA		$\beta$ -Amino iso butyric acid	$\beta$ -アミノイソ酪酸
38	$\gamma$ -ABA		$\gamma$ -Amino-n-butyric acid	$\gamma$ -アミノ-n-酪酸
39	ICys	*	Homo cystine	ホモシスチン
40	ASA-Anhyd	*	Arginino succinic acid anhydrides 1	アルギニノコハク酸 アンヒドライド 1
41	EOH82		Ethanol amine	エタノールアミン
42	Trp		Tryptophan	トリプトファン
43	NH3		Ammonia	アンモニア
44	Hylys		Hydroxylysine	ハイドロオキシリジン
45	AEC	*	Amino ethyl cysteine	アミノエチルシステイン
46	Orn		Ornithine	オルニチン
47	Lys		Lysine	リジン
48	1Mehis		1-Methylhistidine	1-メチル ヒスチジン
49	His		Histidine	ヒスチジン
50	3Mehis		3-Methylhistidine	3-メチル ヒスチジン
51	Ans		Anserine	アンセリン
52	Car		Carnosine	カルノシン
53	Arg		Arginine	アルギニン

【 0 0 0 7 】

ところがこれらの追加成分のほとんどは、特定の時間帯に集中して溶出されるので、従来からある 41 成分用の分析法では、既存の何れかの成分の溶出時間と重複してしまい、ほとんど分離ができない状態にあった。

【 0 0 0 8 】

本発明の目的は、新たに着目されるようになった 12 成分を含む全 53 成分の アミノ酸を一斉に分析でき、且つ出来るだけ効率良く短い時間で分析を行うことが出来る アミノ酸分析方法および装置を提供することである。

【 0 0 0 9 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らが、分離実験を重ねたところ、これら追加成分を含めた 53 成分を一斉に分析可能な分析法を見出した。

【 0 0 1 0 】

本発明の特徴は、緩衝液のリチウムイオン濃度を、少なくとも  $\beta$ -アミノイソ

酪酸 ( $\beta$ -A i B A) が溶出される時間まで  $0.3 \text{ mol/L}$  以下とすることである。

【0011】

また、好ましくは、 $\beta$ -アミノイソ酪酸 ( $\beta$ -A i B A) が溶出される時間まで、前記緩衝液の pH を 3.5 以下とすることである。

【0012】

更に好ましくは、 $\gamma$ -アミノ-n-酪酸 ( $\gamma$ -A B A) からヒドロオキシリジン (H y l y s) までの溶出時間で、リチウムイオン濃度と pH をグラジエントに上昇させることである。

【0013】

更に好ましくは、ヒドロオキシリジン (H y l y s) からヒスチジン (H i s) までの溶出時間で、 $0.81 \text{ mol/L}$  に保持することである。

【0014】

上記に示すように、本発明においては、緩衝液の切替え時間、混合比、グラジエント勾配などの分離改善要因を組み合わせることで、部分的なアミノ酸の分離バランスをよくすることが出来、総合的に 53 成分のアミノ酸を分離することができた。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、従来実施例と比較しながら本発明の実施例の詳細を述べる。

【0016】

図 2 は本発明のアミノ酸分析計の装置構成及び流路説明図である。1～4 はそれぞれ第 1～第 4 緩衝液、5 はカラム再生液である。この中から電磁弁シリーズ 6 によって何れかの緩衝液が選ばれ、緩衝液ポンプ 7 によってアンモニアフィルタカラム 8、オートサンプラ 9 を経由して分離カラム 10 に送られる。オートサンプラ 9 によって導入されたアミノ酸試料は分離カラム 10 で分離される。ここで分離した各アミノ酸は、ニンヒドリンポンプ 12 によって送られてきたニンヒドリン試薬 11 とミキサ 13 で混合し、加熱された反応コイル 14 で反応する。反応によって発色したアミノ酸は検出器 15 で連続的に検知され、データ処理装

置 1 6 によってクロマトグラム及びデータとして出力され、記録、保存される。

【 0 0 1 7 】

上記第 1 緩衝液 1 ～第 4 緩衝液 4 およびカラム再生液 5 としては、市販の L - 8 5 0 0 - P F - K I T ( 三菱化学 ( 株 ) 製 ) を用いた ( 表 2 ) 。ニンヒドリン試薬 1 1 は市販のニンヒドリン試液 L - 8 5 0 0 セット ( 和光純薬工業 ( 株 ) 製 ) を用いた。分離カラム 1 0 にはパッキドカラム 4 . 6 mm I D x 6 0 mm、充填剤としては、イオン交換樹脂 2 6 2 2 S C ( 日立製作所製 ) を用いた。

表 2

緩衝液の組成

名 称	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5 (RG)
リチウムイオン濃度 (mol/L)	0.09	0.255	0.721	1.00	0.20
クエン酸リチウム (4H <sub>2</sub> O) (g)	5.73	9.80	8.79	9.80	
塩化リチウム (g)	1.24	6.36	26.62	38.15	
クエン酸 (g)	19.90	12.0	11.27	3.30	
水酸化リチウム (g)					8.40
エタノール (ml)	30.0	30.0	100.0		30.0
ベンジカルアルコール (ml)			3.0		
チオシタリコール (ml)	5.0	5.0			
BR1J-35 (g)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
カ7°リル酸 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
pH	2.8	3.7	3.6	4.1	
全量 (L)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

## 【 0 0 1 8 】

次に本発明の分析プログラムを図 3 に示す。また、図 3 の緩衝液のグラジエント混合プログラムを図表化したものを図 5 (A) に示す。

## 【 0 0 1 9 】

ここで図 3 の分析プログラムについて説明する。「% B 1 - % B 5」欄は、それぞれ第 1 緩衝液 1 ~ カラム再生液 5 に相当する。時間 0 で、% B 1 - % B 5 の欄に 1 0 0 . 0 とあるのは相当する電磁弁が 1 0 0 % 開くという意味である。

8 0 と 2 0 は、相当する二つの電磁弁が時間比で 8 0 % と 2 0 % に開く、すなわち 8 0 % と 2 0 % に液が混合するという意味である。さらに時間と共に混合比を変え、グラジエント混合が可能となる。図 1 の構成であれば、最大 5 液までグラジエントができる。

## 【 0 0 2 0 】

「温度」は、分離カラムの温度プログラムを示す。3 8 とあるのは次の指定時間まで 3 8 ° C 一定を保つという意味である。

## 【 0 0 2 1 】

「流量 1」は、緩衝液ポンプの流量、「流量 2」はニンヒドリンポンプの流量である。

## 【 0 0 2 2 】

「% R 1 - % R 3」欄は、ニンヒドリン試薬の混合比である。通常ニンヒドリン試薬は 2 液に分かれて市販されており、使用時に R 1 と R 2 は 5 0 % ずつ混合するようになっている。R 3 は蒸留水が設置してあり、分析終了時の洗浄などに使用する。

## 【 0 0 2 3 】

ここで、図 4 に従来行われていた分析プログラムを示す。また、図 4 の緩衝液のグラジエント混合プログラムを図表化したものを図 5 (B) に示す。

## 【 0 0 2 4 】

図 5 から分かるように、従来は基本的に緩衝液は段階的に切替えが行われていた。これに対して、本発明においては、全体の分析時間は長くなるものの、グラジエントを多用し、ゆっくりとした緩衝液の切替えを行うようにしている。

## 【 0 0 2 5 】

図 1 (A) に、図 3 の分析プログラムを使用して得られた、本発明の結果である分析クロマトグラムを示す。また比較のため、図 1 (B) に従来の図 4 の分析プログラムによるクロマトグラムを示す。どちらのクロマトグラムも表 1 に示すアミノ酸試料 5 3 成分を測定したものである。尚、図 1 (A) には各ピークに成分の略語が記載してあるが、表 1 にはアミノ酸の和文名、英文名のほかに、クロマトグラムで使用している略語を記載してあるので参照願いたい。また、図 1 (C) は、図 1 (A) のクロマトグラムと図 1 (B) のクロマトグラムのそれぞれ同じ成分のピークを線で結び表したものである。

## 【 0 0 2 6 】

図 1 から分かるように、図 1 (B) では V a l ~ γ - A B A の成分の間に多くの成分が集中して、良く分離出来ていない。図 1 (B) の V a l ~ γ - A B A 間に相当する部分の拡大を図 6 に示す。S a c c h a と C y s や、T y r と C y s - H c y s などピークが重なっている成分が多く見られる。これに対して、図 1 (A) では各成分が良く分離されていることが分かる。

## 【 0 0 2 7 】

次に、図 1 (A) に示すように、5 3 成分の一斉分析を可能にした本発明の分析プログラムの作成過程について述べる。

## 【 0 0 2 8 】

まず各成分のピーク分離をよくするための要因であるが、分離カラムを固定し、緩衝液の処方を表 2 に固定した場合、次の要因が考えられる。

## 【 0 0 2 9 】

- 1 . L i イオン濃度の強さによるピーク位置の移動
- 2 . p H の強さによるピーク位置の移動
- 3 . カラム温度によるピーク位置の移動
- 4 . 上記 1 . 2 . 3 . の組み合わせ

このほかに、緩衝液ポンプの流速が考えられるがここでは述べない。なお、例えば通常緩衝液ポンプの流速を 2 倍にすると、ほぼ比例的に分析時間が 1 / 2 に変わることは、よく知られていることである。この場合、全体的に各ピーク間の

分離が悪くなることも同時に知られていることである。

【 0 0 3 0 】

以上の要因に基づいて、分離改善する具体的手段としては、次の項目が考えられる。

【 0 0 3 1 】

a : 緩衝液の一定の混合比またはグラジエント混合比を変える。

【 0 0 3 2 】

b : 緩衝液の一定の混合比またはグラジエント混合比の切替え開始時間を変える。

【 0 0 3 3 】

c : 緩衝液の一定の混合比またはグラジエント混合比の切替え終了時間を変える。

【 0 0 3 4 】

d : 緩衝液の一定の混合比またはグラジエント混合比を 3 液以上にする。

【 0 0 3 5 】

e : カラム温度を変える。

【 0 0 3 6 】

f : カラム温度を切替える開始時間を変える

g : カラム温度を切替える終了時間を変える

h : 上記 a ~ g の組み合わせ。

【 0 0 3 7 】

以上の手段を用いた具体的分離改善の実施例を図 9 ~ 図 1 7 を用いて説明する。

【 0 0 3 8 】

尚、分析プログラムの時間（緩衝液切替え時間、カラム温度切替え時間等）は、図 2 の電磁弁シリーズ 6 における時間を基準としているため、クロマトグラムに示された各成分が溶出した時間（保持時間）とは異なるものであるから、その点留意願いたい。分析プログラムの時間と保持時間は、緩衝液が電磁弁シリーズ 6 から検出器 1 5 に至るまでに相当する程度のタイムラグを有しており、具体的

には、約 5 ～ 1 0 分位のずれがある。

【 0 0 3 9 】

図 9 は、分析プログラムの 8 7 分 ～ 1 0 9 分の間で、緩衝液 B 3 = 1 0 0 % の場合 (B) と、三つの緩衝液をグラジエントにした場合 (A) の分離の状態を示したものである。図 9 から緩衝液 B 2, B 3, B 4 を 3 液グラジエントにした方が、 $\gamma$ -ABA ～ Lys 間の分離バランスが良くなることが分かる。特に ASA - Anhy 1 と EOHNH<sub>2</sub> の分離が良くなる。これは、リチウムイオン濃度と pH が B 3 のレベル (Li 濃度: 0.721 mol/L, pH: 3.6) で一定であるよりも、グラジエントに上昇させた方 (Li 濃度: 0.441 mol/L → 1.00 mol/L, pH: 3.66 → 4.1) が良いことを示す。

【 0 0 4 0 】

図 1 0 は、上記図 9 の場合から観点を変えて、9 2 分 ～ 1 1 7 分で B 2 ～ B 4 の 3 液グラジエントにした場合 (A) と、B 3 と B 4 の 2 液グラジエントにした場合 (B) の状態を示す。図 1 0 から、2 液グラジエント (B) よりも 3 液グラジエント (A) の方が ASA - Anhy 1 と EOHNH<sub>2</sub> の分離が良くなることが分かる。同時に Trp と NH<sub>3</sub> の分離も良くなる。これは、リチウムイオン濃度と pH の観点で見ると、(B) Li 濃度: 0.721 mol/L → 1.00 mol/L, pH: 3.6 → 4.1 よりも、(A) Li 濃度: 0.441 mol/L → 1.00 mol/L, pH: 3.66 → 4.1 のグラジエントの方が好ましいといえる。

【 0 0 4 1 】

したがって、上記図 9 の検討も合わせて考慮すると、 $\gamma$ -ABA ～ Lys あたりにおいては、B 2 ～ B 4 の 3 液グラジエントにする方法が最も良い分離バランスを得られることが分かる。本発明の分析プログラムでは、この結果を基に、9 2 分 ～ 1 1 7 分までを B 2 ～ B 4 の 3 液グラジエントとするようにしている。

【 0 0 4 2 】

図 1 1 は、4 5 分から始まる B 3 のグラジエント勾配による分離改善の様子を示したものである。グラジエント勾配を 2 5 % (A) から 1 0 % (C) まで低くすると、Phe ～  $\beta$ -AiBA 間の分離のバランスが良くなることが分かる。ここで、リチウムイオン濃度の変化を観ると、(C) が 0.123 → 0.277 mol/L



L、(B) が  $0.123 \rightarrow 0.280 \text{ mol/L}$ 、(A) が  $0.123 \rightarrow 0.316 \text{ mol/L}$  である。結果は、(B) の状態では各ピークが何とか分離しているが、(A) の状態ではまだ分離しきれていない。このことから、リチウムイオン濃度が  $0.30 \text{ mol/L}$  以上であると  $\text{Phe} \sim \beta\text{-Ala}$  間の分離バランスが悪く不適切といえる。従って、本発明の分析プログラムにおいては、(A) の状態を目標にし、B3については、45分から84分にかけて、10%のグラジエント勾配を有するように設定している。また、92分まで、84分時点の組成を変化させない様にしている。

## 【0043】

図12は、緩衝液B4のグラジエント開始時間を86分～90分で変化させた場合の様子を示す。図12に示されるように、緩衝液B4のグラジエント開始時間を遅くすると、 $\gamma\text{-Ala}$ とHcysが分離し、同時にEOHNH<sub>2</sub>とTrpの分離が改善されることが分かる。従って、本発明の分析プログラムでは、92分からB4を切替えるようにしている。

## 【0044】

図13は、117～130分におけるB2とB4の混合比について検討したものである。図から分かるように、B4の比率を80%から75%に低くすると、AnsとCarの分離が改善されることが分かる。リチウムイオン濃度とpHで観ると、B4比率80%では、Li濃度： $0.851 \text{ mol/L}$ 、pH：4.02であり、B4比率75%では、Li濃度： $0.814 \text{ mol/L}$ 、pH：4.00である。よって、本発明の分析プログラムでは、117～130分のB2とB4の混合比を1：3（B4比率75%）とするようにしている。

## 【0045】

図14は、B4を100%の状態に切替える開始時刻を128分から135分に遅らせた場合について検討したものである。切替える時刻を遅くすると、AnsとCarの分離がよくなるが、Argの溶出時間が遅くなることを示している。したがって、本発明の分析プログラムでは、バランスを考慮して、B4を100%の状態に切替える開始時刻を130分からとしている。

## 【0046】

上記は緩衝液の組成について検討したものであるが、カラム温度についての検討も行ったので図 1 5 ～ 図 1 7 に示す。尚、カラム温度の変化をグラフ化したものを図 1 8 に示す。図 1 8 において、実線 (A) は、図 3 で示した本発明の分析プログラム、破線 (B) は参考として示した図 4 の従来の分析プログラムである。

## 【 0 0 4 7 】

図 1 5 は、カラム温度による Met ～ Cys t h i 間の分離改善を試みたものである。カラム温度を 7 0 ℃ にする時間範囲を、分析プログラムにおいて 4 5 分 ～ 5 0 分の場合と、4 5 分 ～ 5 5 分の場合で実験を行った。この結果、4 5 分 ～ 5 5 分にすると、バランスの良い分離改善ができることが分かった。従って、本発明の分析プログラムでは、カラム温度を 4 5 分 ～ 5 5 分で 7 0 ℃ とするようにしている。

## 【 0 0 4 8 】

図 1 6 は、カラム温度切替え開始時間の変更による P h e ～  $\beta$  - A i B A 間の分離改善を試みたものである。カラム温度を 7 0 ℃ にする切替え開始時間を 8 0 分から 7 0 分に早めていくと、分離が改善されることが分かる。従って、本発明の分析プログラムにおいては、カラム温度 7 0 ℃ の切替え開始時間を 7 3 分で行うことを採用している。

## 【 0 0 4 9 】

図 1 7 は、8 5 分 ～ 1 1 0 分間で、カラム温度を 7 0 ℃ ～ 6 0 ℃ の範囲で変化させた場合の様子を示す。カラム温度が下がると、E O H N H 2 と T r p の分離が改善されることが分かる。従って、本発明の分析プログラムでは、8 5 分 ～ 1 1 0 分の時間帯においては、6 3 ℃ を採用している。

## 【 0 0 5 0 】

以上、図 9 - 図 1 7 に示した部分分離改善を組合わせることにより、図 3 及び図 5 (A) に示す本発明の分析プログラムが求められ、図 1 (A) の分離結果が実現する。

## 【 0 0 5 1 】

上記本発明の分析プログラムにおいては、複数の緩衝液を混合し、且つカラム

温度を調整しているが、53成分のピークを上手く分離できた要因としては、前述したように、「Liイオン濃度の強さ」「pHの強さ」「カラム温度」が大きな要因である。そこで、図7、図8に分析プログラムに沿ったLiイオン濃度とpHの変化の様子を示す。

#### 【0052】

図7は、本発明と従来の分析プログラムにおけるLiイオン濃度の変化をグラフ化したものである。実線(A)は図3に示す本発明の分析プログラム、破線(B)は図4の従来の分析プログラムに対応する。このグラフから分かるように、(A)に示す本発明のプログラムは、(B)の従来のプログラムに比べて、Liイオン濃度の上昇が非常にゆっくりであり、且つ徐々に上昇するようになっている。

#### 【0053】

また図8は、図7と同様に(A)が本発明の図3の分析プログラム、(B)が図4の従来の分析プログラムに対応するものであり、pHについての変化を測定しグラフ化したものである。本発明の分析プログラムにおいては、pHもその上昇を大幅に抑えるようにしている。

#### 【0054】

ここで、本発明の分析プログラムについて、図9～図17に示した部分分離改善を基に、そのポイントを纏めると以下の様になる。

1.  $\gamma$ -ABA～Lys間の分離バランスを改善するためには、Li濃度を0.44 mol/Lから1.00 mol/Lに、pHを3.66から4.1にグラジエントに上昇させる。本発明ではこれを3液グラジエントで実施する。また、この3液グラジエントを行う時間は、分析プログラムと保持時間のずれを考慮し、 $\beta$ -AiBAからHylysが溶出される時間（保持時間）で行うようにする。本発明の分析プログラムでは、87分～109分の間となる。
2. Phe～ $\beta$ -AiBA間の分離バランスを改善するためには、Li濃度が0.30 mol/L以下となるようにグラジエントさせる。具体的には、分析プログラムと保持時間のずれを考慮し、valから $\beta$ -AiBAが溶出される時間（保持時間）で緩衝液B3のグラジエントの勾配を10%に保ち、 $\beta$ -AiBA溶出

時で  $Li$  濃度が  $0.30 \text{ mol/L}$  以下となるようにする。本発明の分析プログラムでは、45分～92分間の動作となる。

3.  $\gamma$ -ABA と Hcy s 間の分離バランスを改善するためには、緩衝液 B4 のグラジェント開始時間を（分析プログラムと保持時間のずれを考慮し、） $\beta$ -AiBA が溶出される時間（保持時間）からとする。本発明の分析プログラムでは、92分からとなる。

4. Ans と Arg 間の分離バランスを改善するためには、 $Li$  濃度を  $0.81 \text{ mol/L}$ 、pH を 4.00 とする。本発明ではこれを B2 と B4 の混合（B4 比率 75%）で実施する。また、この  $Li$  濃度・pH にする時間は、分析プログラムと保持時間のずれを考慮し、Hyllys から His が溶出される時間（保持時間）で行うようにする。本発明の分析プログラムでは、117分～130分の間となる。

#### 【0055】

また、His 溶出後（分析プログラム 130 分以降）は、緩衝液 B4 を 100% にし、 $Li$  濃度を  $1.00 \text{ mol/L}$ 、pH を 4.1 とする。

5. Met ~ Cyst hi 間の分離バランスを改善するために、分析プログラムと保持時間のずれを考慮し、val から Hcit の溶出時間（分析プログラムで 45分～55分）中、カラム温度を  $70^\circ\text{C}$  に保つようにする。

6. Phe ~  $\beta$ -AiBA 間の分離バランスを改善するために、分析プログラムと保持時間のずれを考慮し、Tyr の溶出時間（分析プログラムで 73 分）から、カラム温度を  $70^\circ\text{C}$  に切替える。

7. EOHNH<sub>2</sub> と Trp の分離バランスを改善するために、分析プログラムと保持時間のずれを考慮し、Cys - HCys から Trp の溶出時間（分析プログラムで 85分～110分）中、カラム温度を  $63^\circ\text{C}$  に保つようにする。

#### 【0056】

上記に示すように、53 成分全体の分離が可能となった要因としては数々のポイントが上げられるが、代表的なものとして、 $Li$  イオン濃度、pH について、少なくとも  $\beta$ -AiBA の溶出時間まで低いレベルに抑えたことが挙げられる。これにより、最もピークが密集した部分の分離バランスが大きく改善している。

【 0 0 5 7 】

本発明の分析プログラムを採用したことによる効果を纏めると以下の様になる。

- 1) 緩衝液切替え時間の適正化によって、53成分を同時に分析した場合でも各成分のピークがバランス良く分離でき、且つ、分析時間も148分に抑えることができた。
- 2) 緩衝液の処方に手を加えることなく、従来と同じ緩衝液をそのまま活用することができた。
- 3) 分析装置のハードウェアや、分離カラムを変更することなく、分析プログラムのみの改善によって、53成分の分離が実現した。

【 0 0 5 8 】

【発明の効果】

本発明により、臨床分野において重要な53成分の一斉同時分析が行える。これにより、臨床分野に好適なアミノ酸分析計を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

(A) は本発明の分析プログラムによる53成分のアミノ酸を分離したクロマトグラム、(B) は従来の分析プログラムによるクロマトグラムである。

【図2】

使用する装置の流路説明図である。

【図3】

本発明の分析プログラムである。

【図4】

従来の分析プログラムである。

【図5】

(A) が図3の分析プログラムを図表化したもの、(B) が図4の分析プログラムを図表化したものである。

【図6】

図5 (B) のクロマトグラムの部分拡大図である。

【図 7】

本発明の分析プログラムの L i イオン濃度グラフである。

【図 8】

本発明の分析プログラムの p H グラフである。

【図 9】

(A) は 8 7 分～1 0 9 分において三つの緩衝液をグラジエントにした場合の分離の状態、(B) は緩衝液 B 3 = 1 0 0 % の場合の分離の状態を示す図である。

【図 1 0】

(A) は 9 2 分～1 1 7 分で B 2 ～B 4 の 3 液グラジエントにした場合、(B) は B 3 と B 4 の 2 液グラジエントにした場合の状態を示す図である。

【図 1 1】

B 3 のグラジエント勾配による分離改善の様子を示したものである。

【図 1 2】

緩衝液 B 4 のグラジエント開始時間を 8 6 分～9 0 分で変化させた場合の様子を示した図である。

【図 1 3】

B 3 と B 4 の混合比を変更した場合の図である。

【図 1 4】

B 4 を 1 0 0 % の状態に切替える開始時刻を 1 2 8 分から 1 3 5 分に遅らせた場合について検討した図である。

【図 1 5】

カラム温度変化による M e t ～C y s t h i 間の分離改善を示す図である。

【図 1 6】

カラム温度切替え開始時間を変化させた場合の P h e ～ $\beta$  - A i B A 間の分離改善を示す図である。

【図 1 7】

8 5 分～1 1 0 分でカラム温度を 7 0 ℃から 6 0 ℃に下げた場合の様子を示す図である。

【図 1 8】

本発明と従来の分析プログラムにおけるカラム温度変化を示すグラフである。

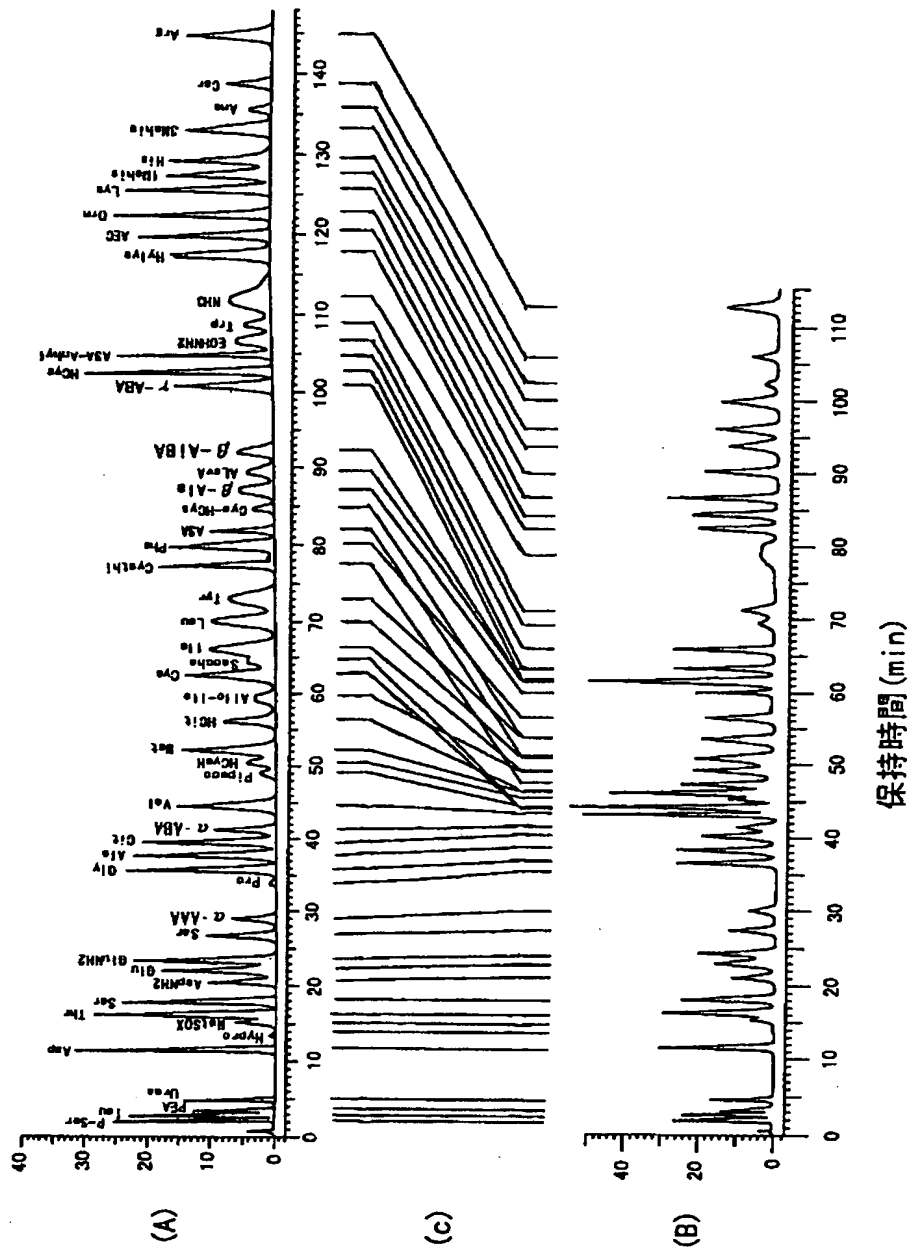
【符号の説明】

1 ～ 4 … 緩衝液、 5 … 再生液、 6 … 電磁弁シリーズ、 7 … 緩衝液ポンプ、 8 … フィルタ、 9 … オートサンプラ、 1 0 … 分離カラム、 1 4 … 反応装置、 1 5 … 検出器、 1 0 1 ～ 1 5 3 … アミノ酸成分リスト。

【書類名】 図面

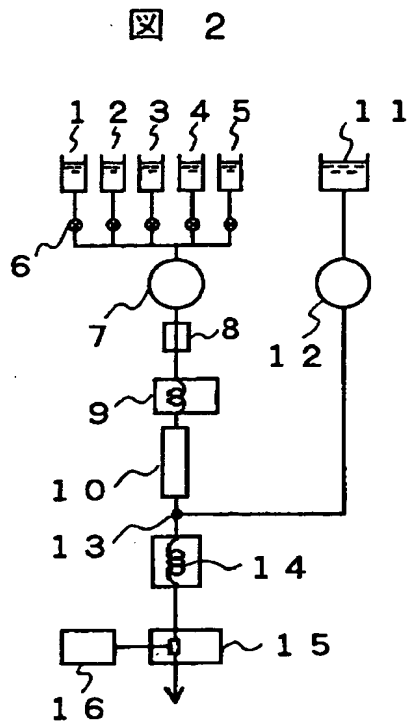
【図 1】

図 1





【図 2】



【図 3】

図 3

時間 (min)	%B1	%B2	%B3	%B4	%B5	温度 (C)	流量1 (ml/min)	%R1	%R2	%R3	流量2 (ml/min)
0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38	0.350	50.0	50.0	0.0	0.300
2.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	35					
20.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
20.0	80.0	20.0	0.0	0.0	0.0	60					
45.0	80.0	20.0	0.0	0.0	0.0	70					
55.0						40					
73.0						70					
84.0	15.0	75.0	10.0	0.0	0.0						
85.0						63					
92.0	15.0	75.0	10.0	0.0	0.0						
92.1	0.0	60.0	40.0	0.0	0.0						
105.0						70					
117.0	0.0	20.0	0.0	80.0	0.0						
117.1	0.0	25.0	0.0	75.0	0.0						
130.0	0.0	25.0	0.0	75.0	0.0						
130.1	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0						
145.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0						
145.1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0			50.0	50.0	0.0	
149.0								0.0	0.0	100.0	
149.1											
153.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0						
153.1	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
155.0						38					
159.0											
159.1								0.0	0.0	100.0	
178.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0			50.0	50.0	0.0	

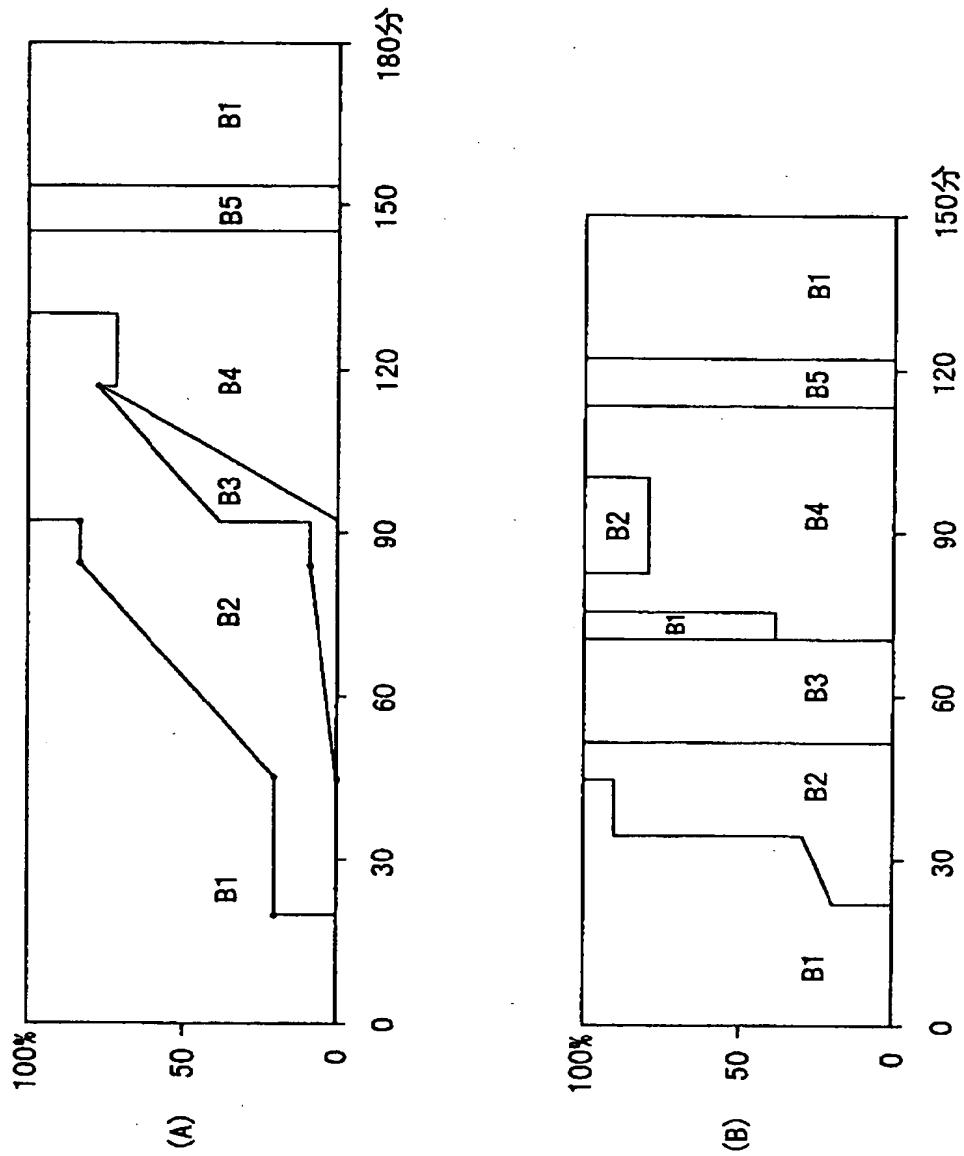
【図 4】

図 4

時間 (min)	%B1	%B2	%B3	%B4	%B5	温度 (C)	流量1 (ml/min)	%R1	%R2	%R3	流量2 (ml/min)
0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38	0.350	50.0	50.0	0.0	0.300
2.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33					
21.5	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
21.6	80.0	20.0	0.0	0.0	0.0	62					
33.5	70.0	30.0	0.0	0.0	0.0						
33.6	10.0	90.0	0.0	0.0	0.0	40					
36.5	10.0	90.0	0.0	0.0	0.0						
43.5	10.0	90.0	0.0	0.0	0.0						
43.6	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	70					
50.5	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0						
50.6	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	45					
68.4	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0						
69.5	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0						
69.6	60.0	0.0	0.0	40.0	0.0						
75.0	60.0	0.0	0.0	40.0	0.0						
75.1	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0						
82.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	70					
82.1	0.0	20.0	0.0	80.0	0.0						
92.5	0.0	20.0	0.0	80.0	0.0						
99.5	0.0	20.0	0.0	80.0	0.0						
99.6	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0						
112.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
112.6	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0						
116.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
116.1	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0						
121.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
121.6	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
125.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38					
126.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
126.1	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
148.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0						

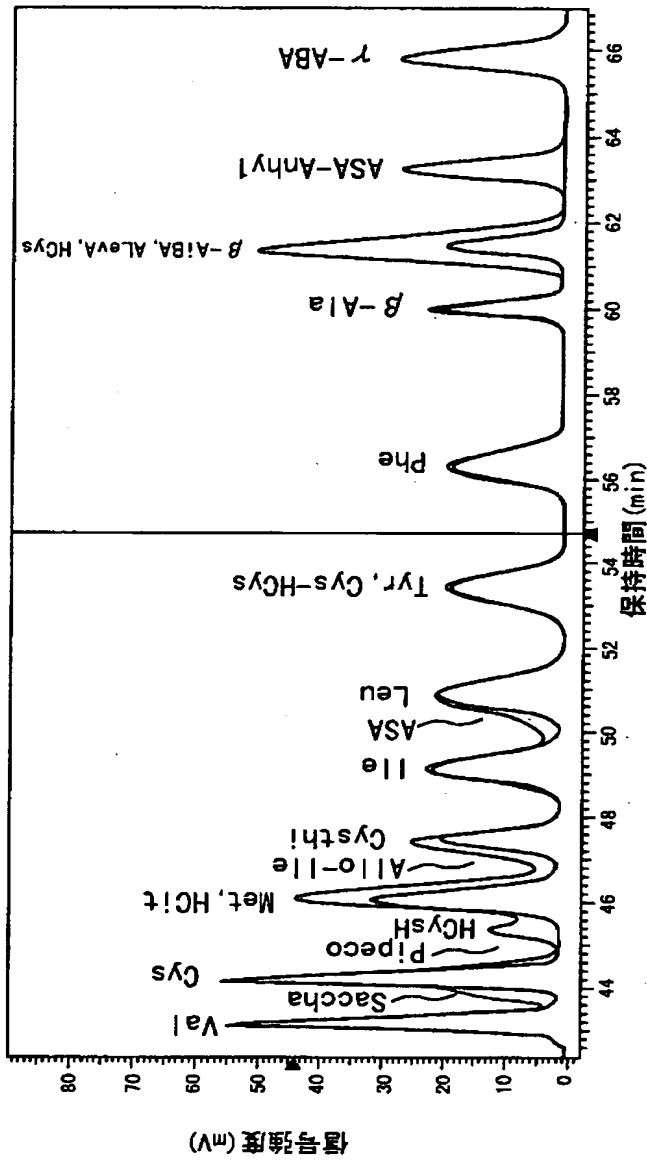
【図 5】

図 5



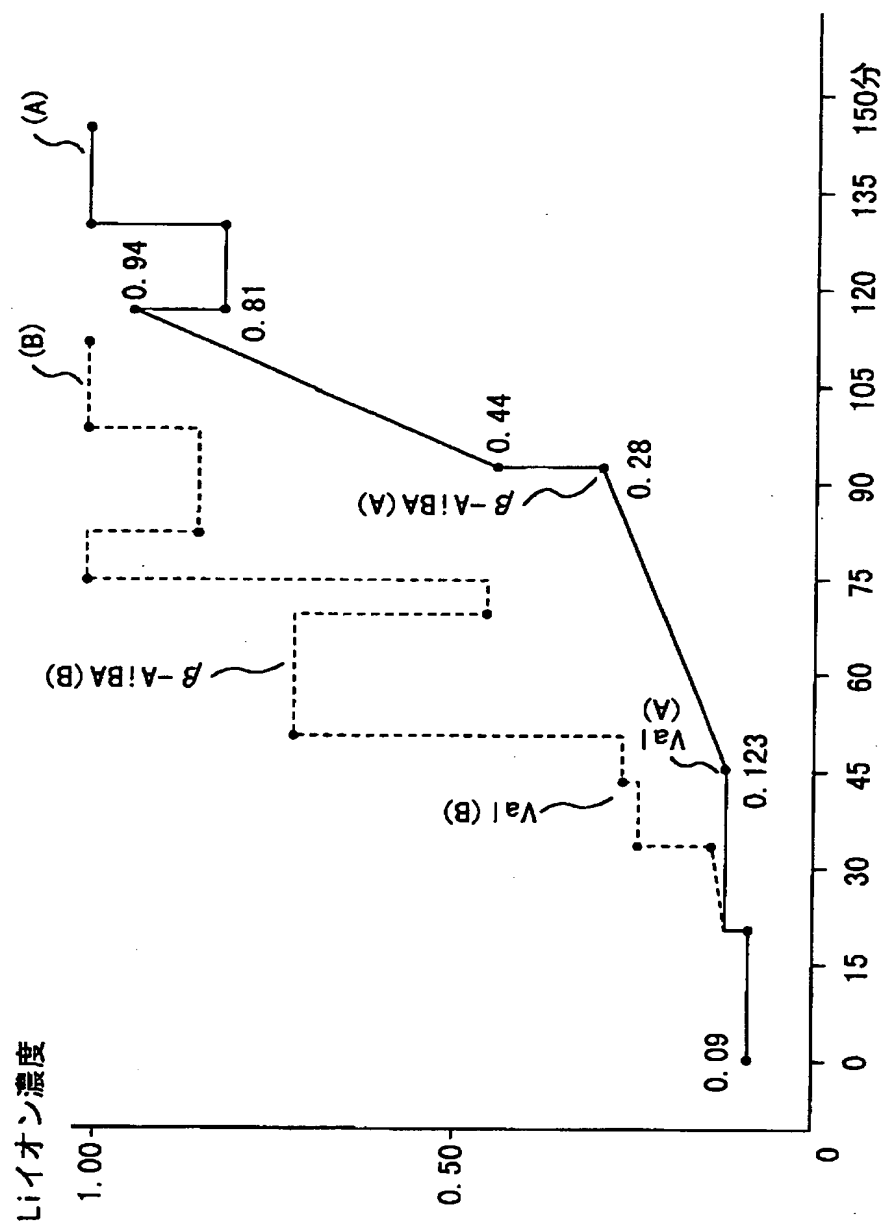
【図6】

図 6



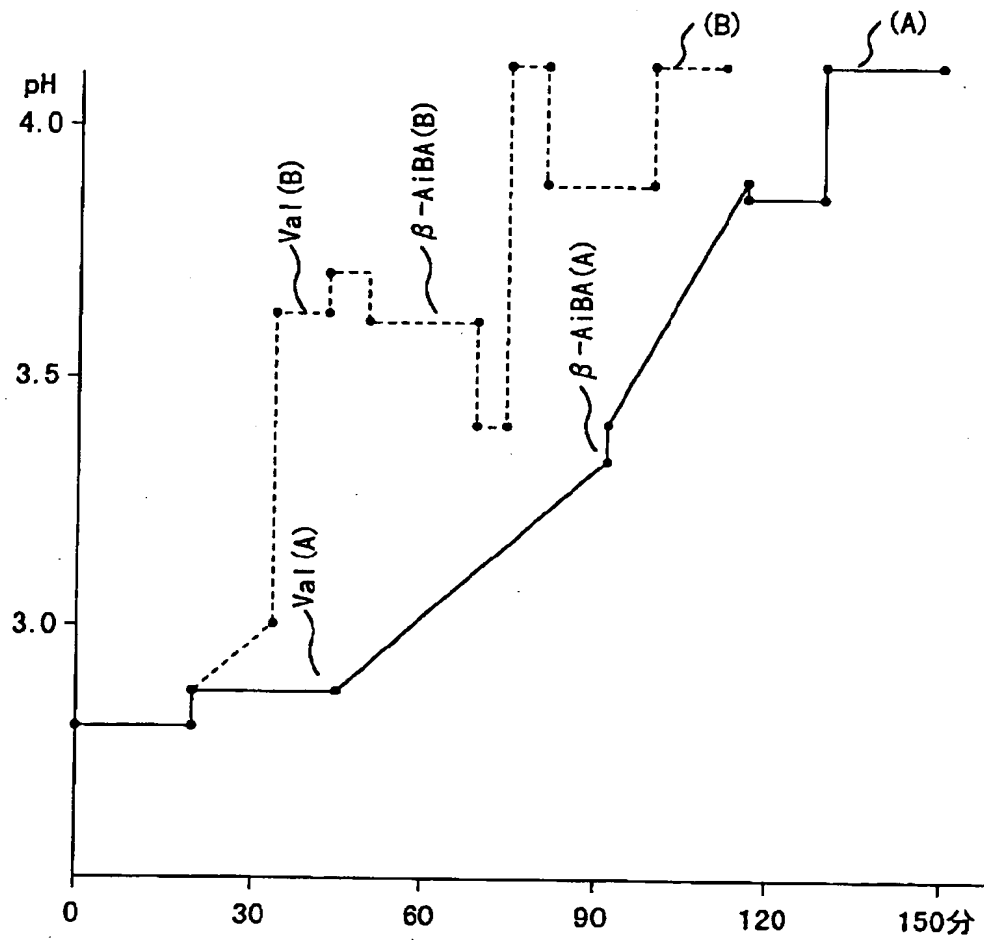
【図 7】

図 7



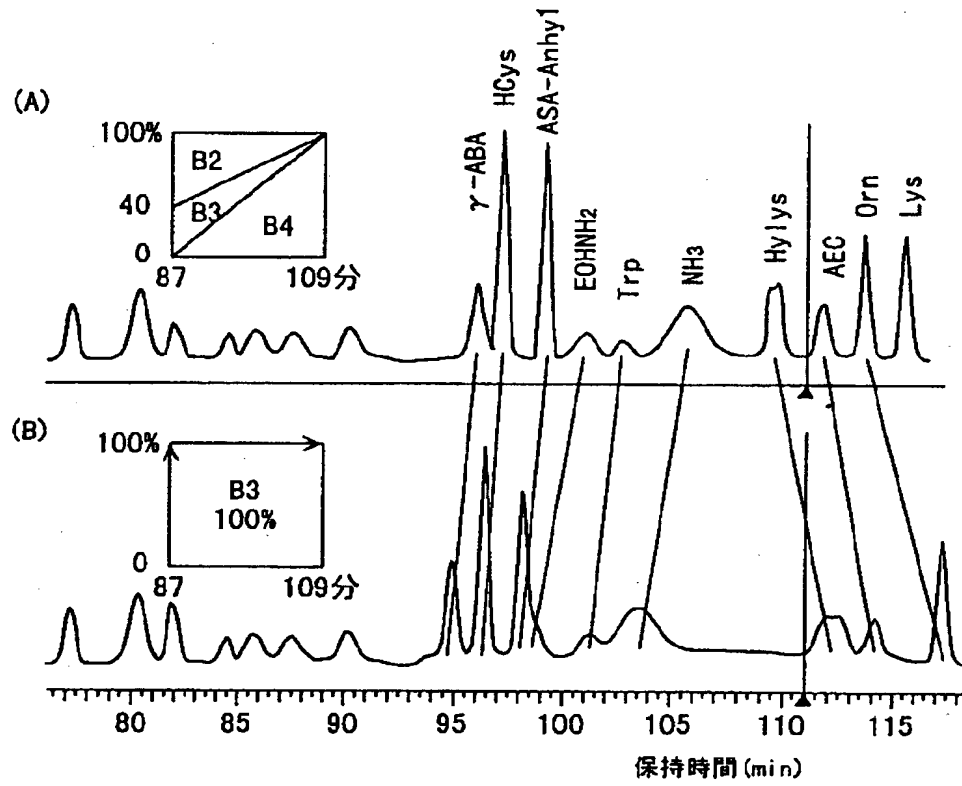
【図 8】

図 8



【図9】

図 9

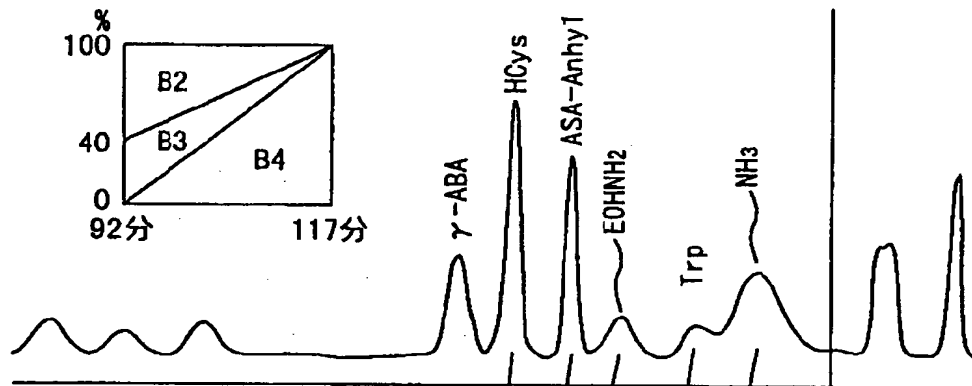




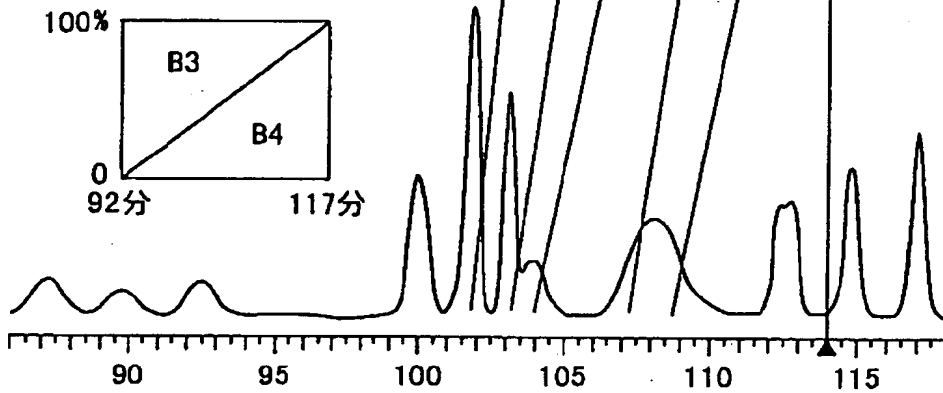
【図10】

図 10

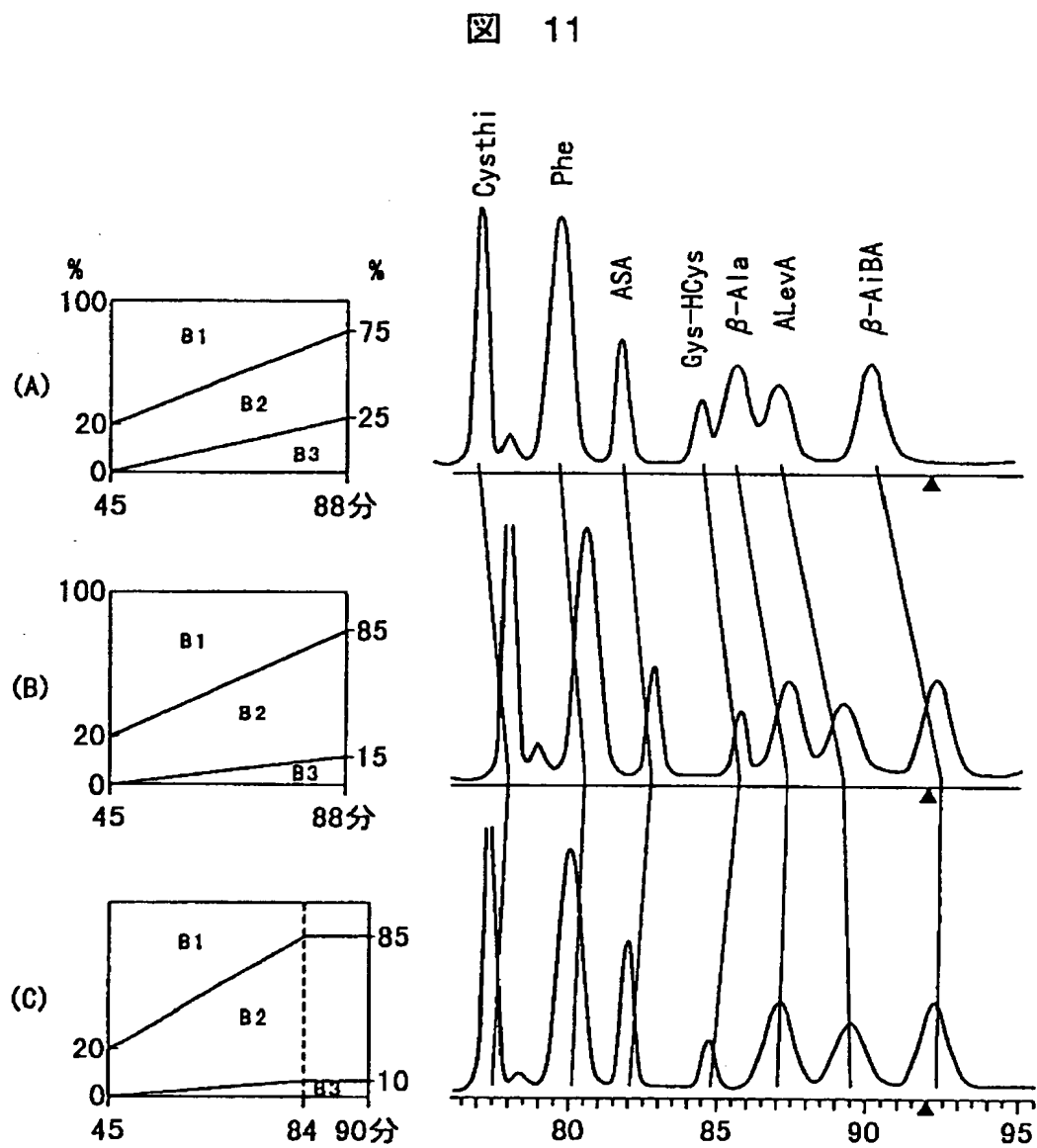
(A) 3液グラジエント



(B) 2液グラジエント

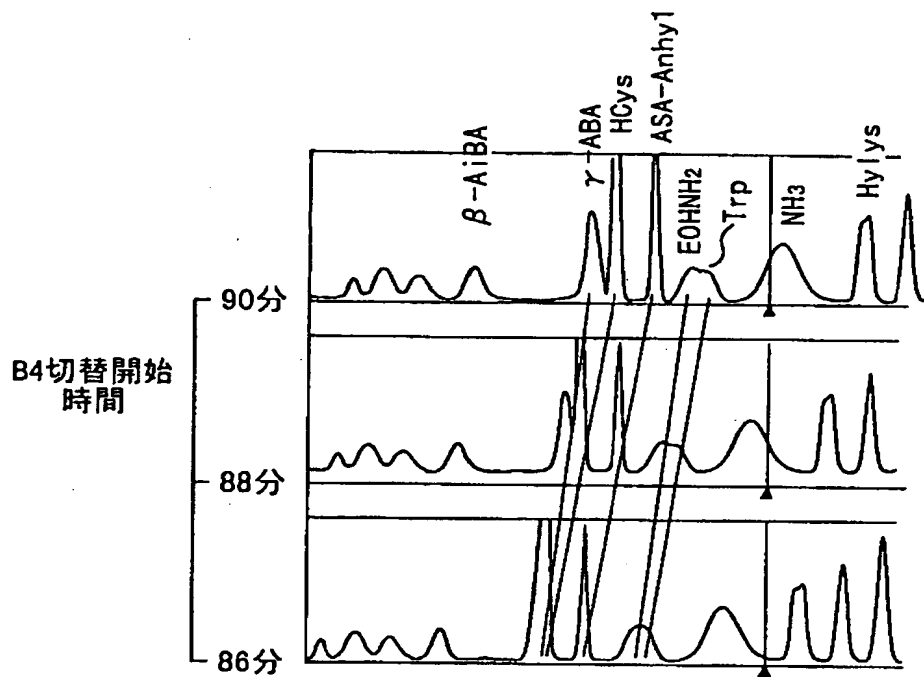


【図 11】



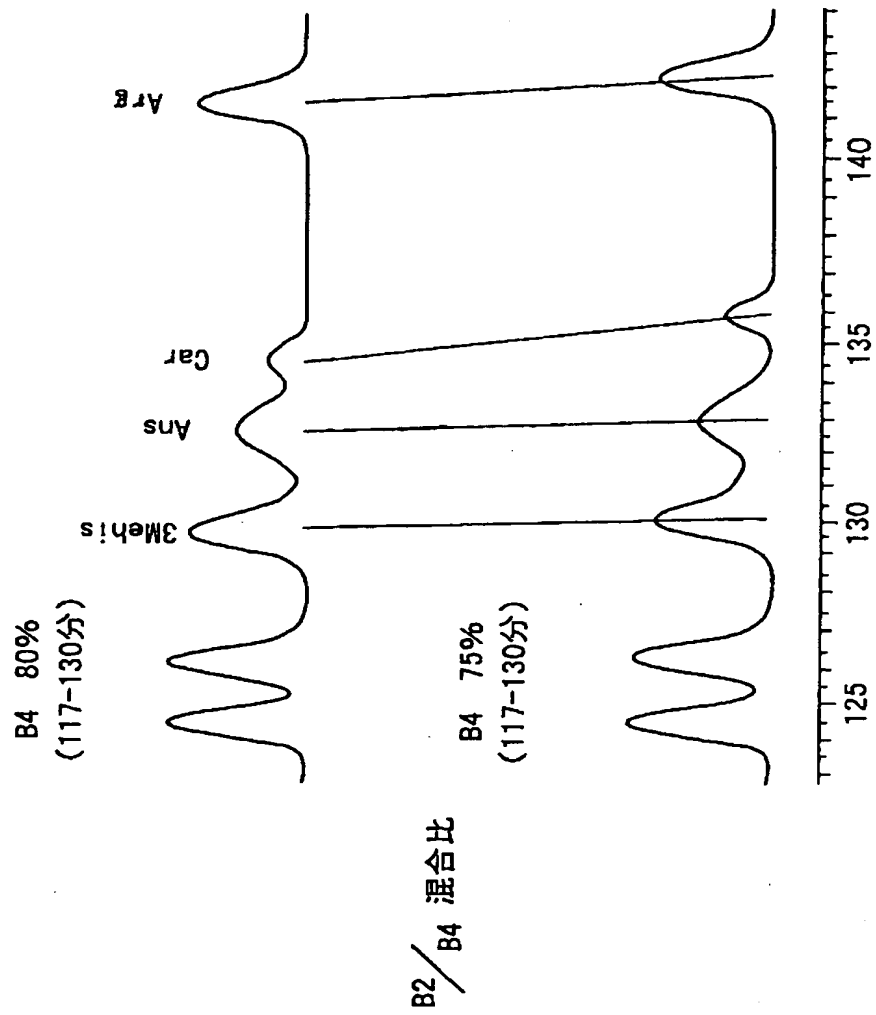
【図 12】

図 12



【図 13】

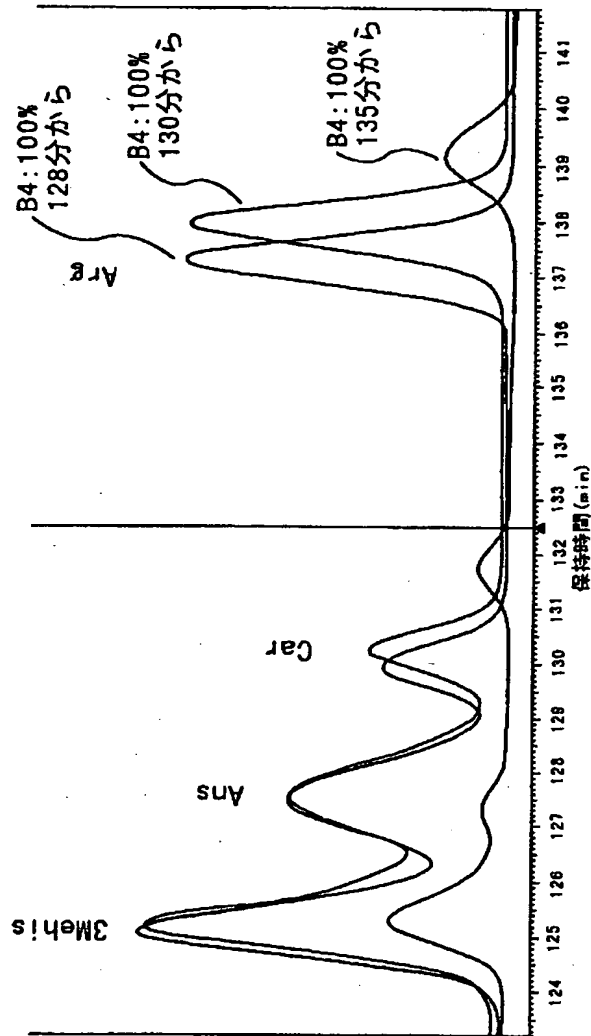
図 13



【図 1 4】

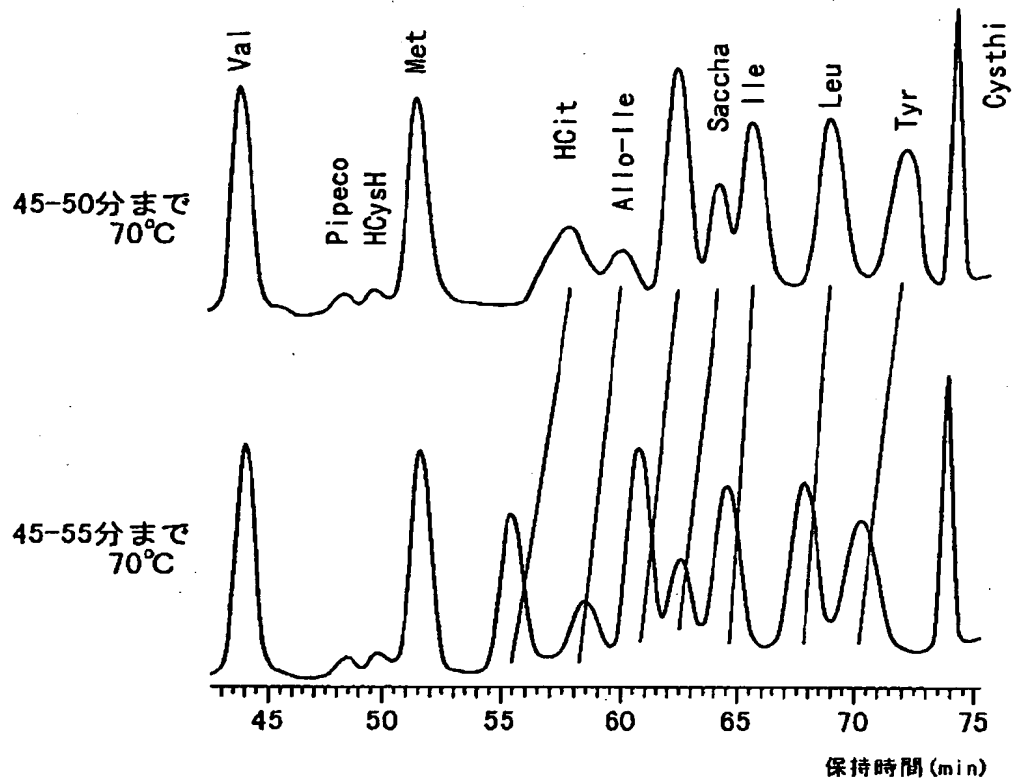
図 14

Argの溶出を早める



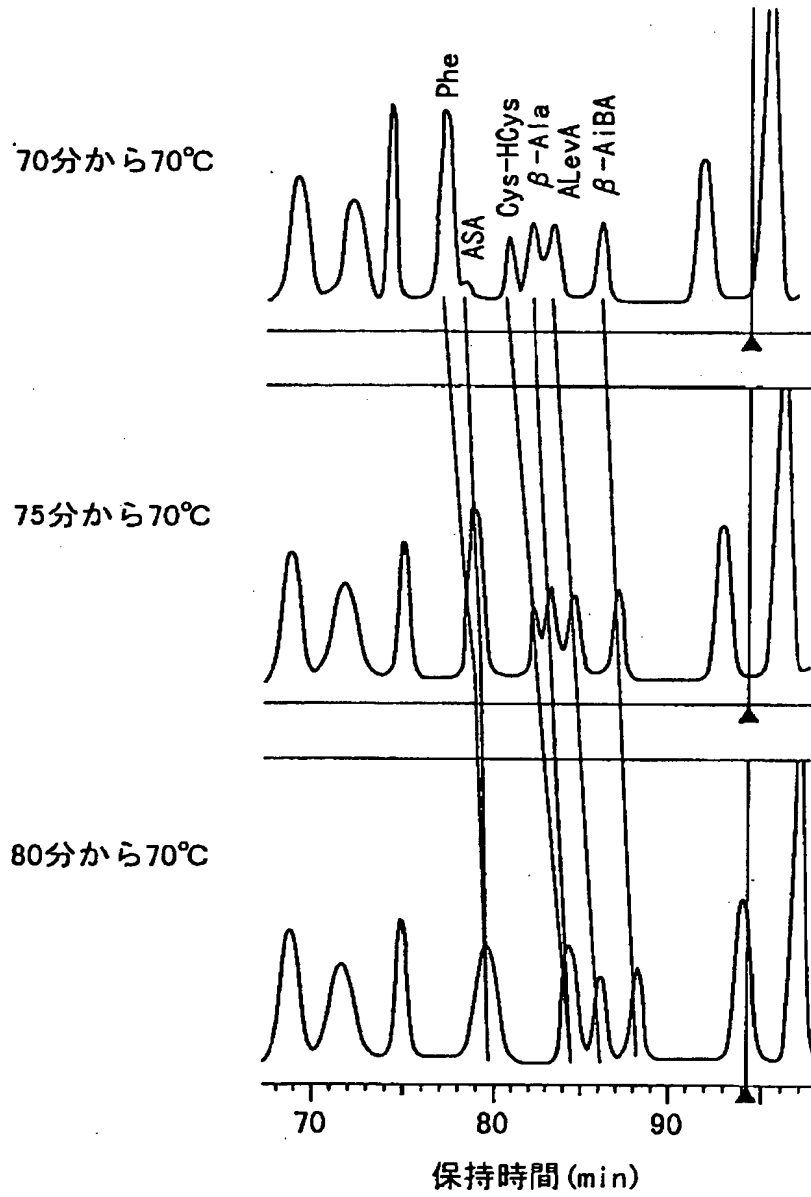
【図15】

図 15



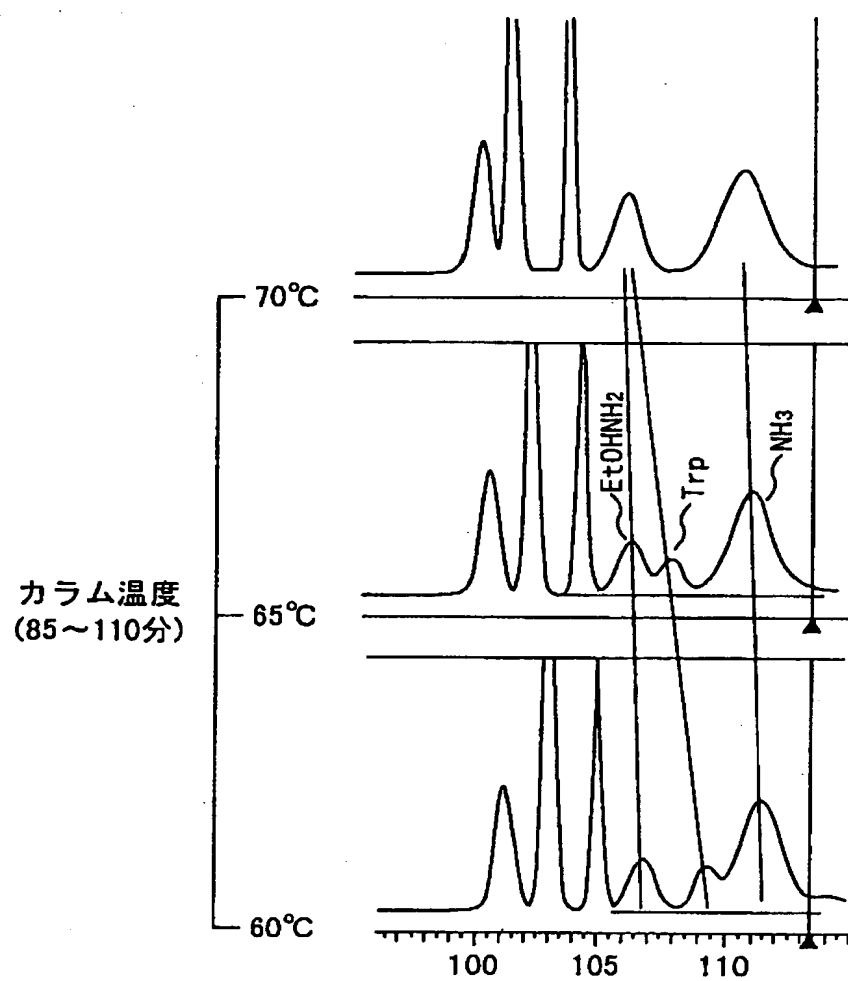
【図 1 6】

図 16



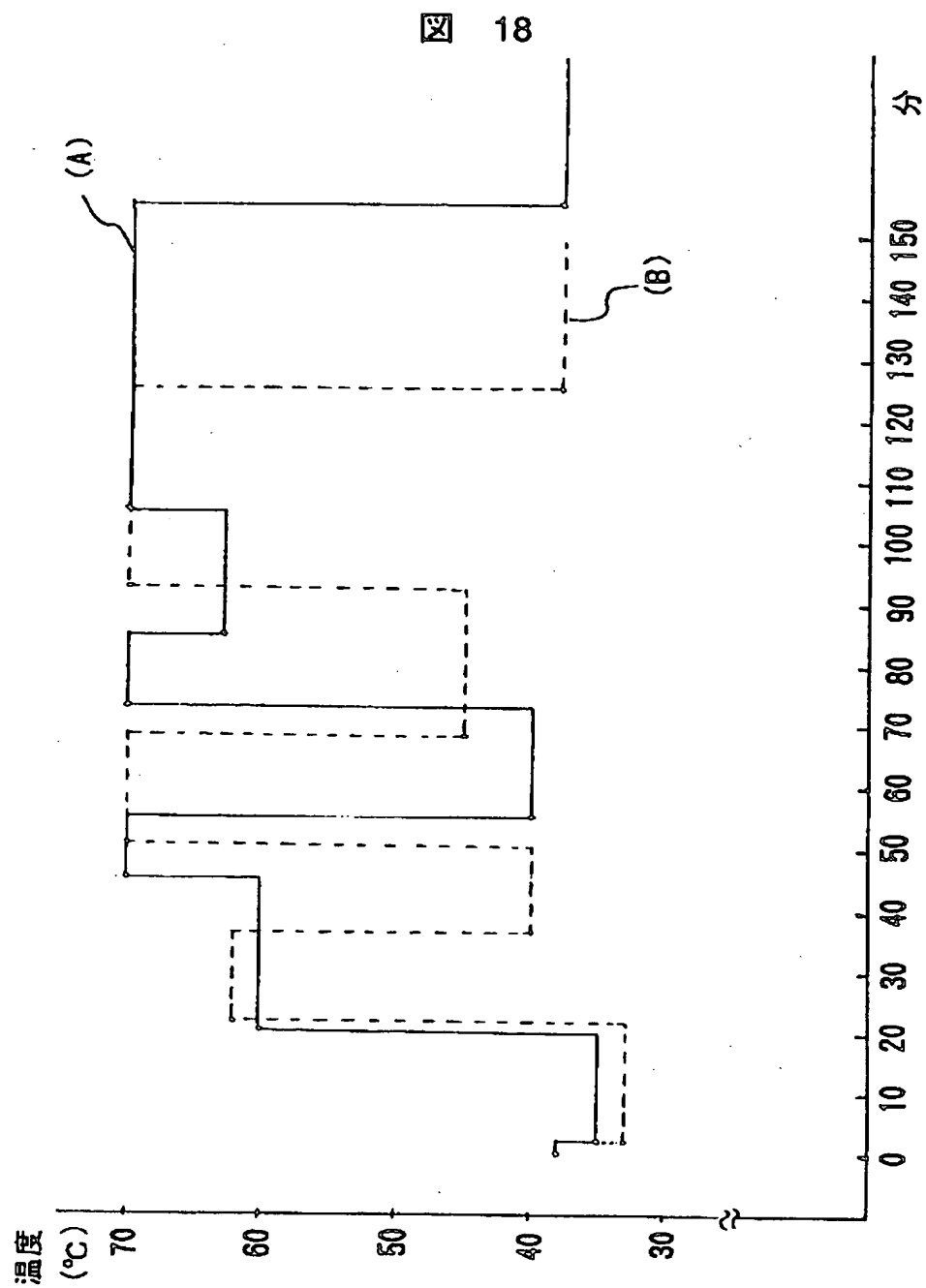
【図 17】

図 17





【図 18】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

53成分を一斉に分析可能なアミノ酸分析方法を提供する。

【解決手段】

一つまたは複数種が混合された緩衝液に試料を導入し、分離カラムを通過させて、生体液アミノ酸類縁物質を検出対象とした生体液分析を行うアミノ酸分析方法において、前記試料が導入される緩衝液のリチウムイオン濃度を、少なくともβ-アミノイソ酪酸(β-AiBA)が溶出される時間まで0.3mol/L以下とすることを特徴とする。

【効果】

臨床分野に好適なアミノ酸分析計を提供できる。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-269864
受付番号	50005045041
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年 9月 4日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 9月 1日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日	1990年 8月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名	株式会社日立製作所